

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-297494

(43) 公開日 平成4年(1992)10月21日

| (51) Int.Cl. <sup>5</sup> | 識別記号    | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|---------------------------|---------|---------|-----|--------|
| C 0 7 K 7/06              | Z N A Z | 8318-4H |     |        |
| A 6 1 K 37/02             | A C B   |         |     |        |
|                           | A D U   | 8314-4C |     |        |
| C 0 7 K 7/08              |         | 8318-4H |     |        |
| 7/10                      |         | 8318-4H |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数3(全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-62147

(22) 出願日 平成3年(1991)3月26日

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社  
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 塚田 芳久

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フイルム株式会社内

(72) 発明者 織笠 敦

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フイルム株式会社内

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

(54) 【発明の名称】 ペプチド誘導体とその用途

(57) 【要約】

【構成】 下記一般式〔I〕で表されるペプチド誘導体またはその塩、それを有効成分とする動物細胞の接着阻害剤及び血小板凝集・粘着抑制剤。

一般式〔I〕

$$(\text{Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr-}[\text{Gly}])_n\text{-OCH}_2\text{-CH(OR}^1\text{)-CH}_2\text{OR}^2$$

式中、Glu、Ile、Leu、Asp、Val、Pro、Ser、Thr は、それぞれグルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン酸、バリン、プロリン、セリン、トレオニン残基を表す。[Gly] は存在するかあるいは存在しないグリシン残基を表す。n は1から3までの整数を表す。R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、水素あるいは炭素数8から24までの直鎖または分岐のアシル基またはアルキル基を表し、置換基、不飽和基を有していてもよい。また、分子内に存在する不斉炭素に関しては、ラセミ体でも光学活性体のいずれでもよい。

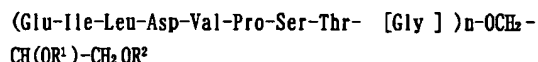
【効果】 EILDVPST部位がフィブロネクチンレセプターと結合できるので、ガン転移抑制、血小板凝集抑制、リンパ球活性化の目的に使用できる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式〔I〕で表されるペプチド誘導体またはその塩。

一般式〔I〕



式中、Glu、Ile、Leu、Asp、Val、Pro、Ser、Thrは、それぞれグルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン酸、バリン、プロリン、セリン、トレオニン残基を表す。〔Gly〕は存在するかあるいは存在しないグリシン残基を表す。nは1から3までの整数を表す。R<sup>1</sup> および R<sup>2</sup> は、水素あるいは炭素数8から24までの直鎖または分岐のアシル基またはアルキル基を表し、置換基、不飽和基を有していてもよい。また、分子内に存在する不斉炭素に関しては、ラセミ体でも光学活性体のいずれでもよい。

【請求項2】 請求項1記載のペプチド誘導体またはその塩を有効成分とする動物細胞の接着阻害剤。

【請求項3】 請求項1記載のペプチド誘導体またはその塩を有効成分とする血小板凝集・粘着抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、グルタミン酸-イソロイシン-ロイシン-アスパラギン酸-バリン-プロリン-セリン-トレオニンのオクタペプチド単位を有する、リボソームあるいはミセル等の分子集合体を形成するのに最適なペプチド誘導体またはその塩、およびこれを有効成分とする動物細胞の接着阻害剤並びに血小板凝集・粘着抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】フィブロネクチンは細胞-細胞外基質の接着に関与するタンパク質であり、血小板凝集やガン転移にも関与していると考えられている。これらの相互作用は一連の細胞表面のレセプターにより仲介され、フィブロネクチンは分子量約25万の巨大分子であるにもかかわらず、これらのレセプターがそのアルギニン-グリシン-アスパラギン酸（以下、Arg-Gly-Aspと略す）配列を特異的に認識することが明らかにされ、レセプターとの相互作用に重要なものであることが報告されている（Nature, 309, 30(1984)）。以来、Arg-Gly-Asp配列を有するオリゴあるいはポリペプチドを用いる研究が成

されている例えば、Arg-Gly-Asp配列を有する種々の鎖状および環状のオリゴペプチドを用いて血小板凝集を阻害する方法（高分子学会予稿集（Polymer Preprints, Japan）、38、3149(1989)、特開平2-174797号）、Arg-Gly-Asp配列を有するペプチドを細胞移動抑制剤として用いる方法（特開平2-4716号）、Arg-Gly-Aspを固定化したPMMA膜を細胞接着膜として用いる方法（高分子学会予稿集（Polymer Preprints, Japan）、37、705(1988年)）が報告されている。さらに、ポリマーにArg-Gly-As

2

pを必須構成単位とするペプチドを共有結合させ動物細胞培養基、生体複合人工臓器用基体として用いる方法（特開平1-309682号、特開平1-305960号）、Arg-Gly-Asp-Ser配列を有するポリペプチドを体外血液用血小板保護剤として用いる方法が開示されている（特開昭64-6217号）。また、Arg-Gly-Asp配列を有するオリゴペプチドあるいはその繰り返し構造を有するポリペプチドを用いて、ガン転移を抑制する方法が知られている（Int. J. Biol. Macromol., 11, 23, (1989)、同誌、11, 226 (1986)、Jpn. J. Cancer Res., 60, 722(1989)）。

【0003】一方、最近フィブロネクチン分子内にはArg-Gly-Asp配列以外の細胞接着配列が存在することも明らかにされ、そのひとつとしてIII CS (type III homology connecting segment) 領域内に存在するCS1ペプチド（グルタミン酸-イソロイシン-ロイシン-アスパラギン酸-バリン-プロリン-セリン-トレオニン配列を含む）が注目されている（J. Biol. Chem., 262, 6886(1987)）。このペプチドは、Arg-Gly-Aspペプチドと同様にフィブロネクチンレセプターに認識され、フィブロネクチンの接着特異性に寄与していると考えられている。現在では、その接着活性の最小単位がグルタミン酸-イソロイシン-ロイシン-アスパラギン酸-バリン-プロリン-セリン-トレオニン（以下、EILDVPSTと略す）配列を有するオクタペプチドであることが明らかにされている（J. Cell Biol., 107, 2189(1988)）。

【0004】一方、EILDVPST配列を有するオリゴペプチドあるいはその繰り返し構造を有する、リボソームあるいはミセル等の分子集合体を形成するのに最適なペプチド誘導体は知られておらず、これらの化合物はレセプターとの結合能の増強および血液中的安定化が期待できる。

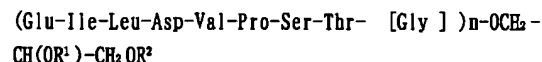
【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、EILDVPSTのオクタペプチド単位を有する、ペプチド誘導体およびその合成法を提供することにある。本発明の他の目的は、これを有効成分とする動物細胞の接着阻害剤および血小板凝集・粘着抑制剤を提供することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明の化合物は、下記一般式〔I〕で規定されるペプチド誘導体であり、分子内に存在するイオン性基は適当なイオンと塩を形成してもよい。

一般式〔I〕



式中、Glu、Ile、Leu、Asp、Val、Pro、Ser、Thrは、それぞれグルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、アスパラギン酸、バリン、プロリン、セリン、トレ

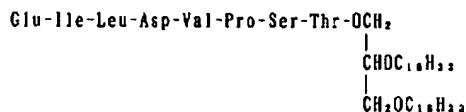
3

オニン残基を表す。[Gly] は存在するかあるいは存在しないグリシン残基を表す。n は1から3までの整数を表し、1または2が特に好ましい。R<sup>1</sup> およびR<sup>2</sup> は、水素あるいは炭素数8~24の直鎖または分岐のアシル基またはアルキル基であり、置換基、不飽和基を有していてもよい。好ましい炭素数は、12から18までである。アシル基としては、ミリストイル基、パルミトイル基、ステアロイル基が好ましい例として示される。アルキル基としては、ミリスチル基、パルミチル基、ステアリル基、3, 7, 11, 15-テトラメチルヘキサデシ

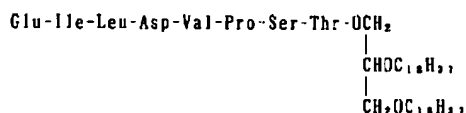
10

【化1】

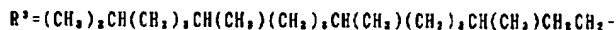
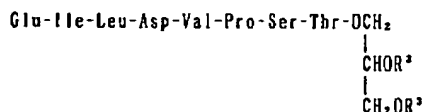
化合物(1) (配列番号1)



化合物(2) (配列番号1)



化合物(3) (配列番号1)

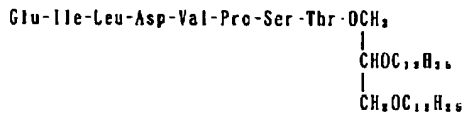


【0009】

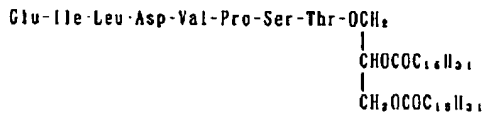
【化2】

5

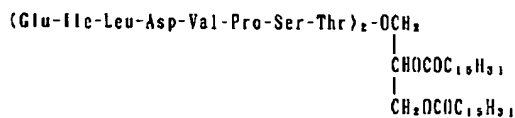
化合物(4) (配列番号1)



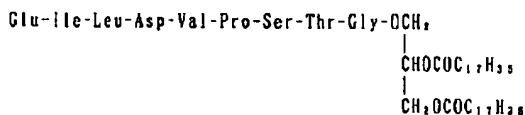
化合物(5) (配列番号1)



化合物(6) (配列番号2)



化合物(7) (配列番号3)



【0010】本発明の化合物は、レセプターとの結合能の増強および血液中での安定化が期待され、EILDVPST部位がガン細胞、血小板、リンパ球等の表面に存在するフィブロネクチンレセプターと結合できることを利用して、ガン転移抑制、血小板凝集抑制、リンパ球活性化の目的に使用することができる。

【0011】次に本発明の化合物の合成法について説明する。本発明の化合物は基本的に以下の方法により合成することができる。

- ① ジアルキル(ジアシル)グリセロールの合成
- ② 保護アミノ酸の逐次延長による保護ペプチドの合成
- ③ 保護ペプチドとジアルキル(ジアシル)グリセロールの縮合
- ④ 保護基の除去および精製

以下、各段階について具体的に説明する。① ジアルキル(ジアシル)グリセロールは、公知の方法(例えばBiochemistry, 2, 394(1963))により合成することができる、また市販品を購入することもできる。② 保護アミノ酸を逐次伸長する方法は、既知の方法、すなわち、泉屋ら著「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)やBodanszky著「PRINCIPLES OF PEPTIDE SYNTHESIS」、THE PRACTICE OF PEPTIDE SYNTHESIS (Springer Verlag, New York)に記載されている方法がいずれも有効である。縮合反応の段階では、DCC-additive法、アジド法、混合酸無水物法、活性エステル法のいずれを採用してもよいが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとジシクロヘキシルカルボジイミドを併用するDCC-additive法が最も良

6

好な結果を与える。③ 保護ペプチドとジアルキル(ジアシル)グリセロール誘導体の縮合は、ジアルキル(ジアシル)グリセロール誘導体、保護ペプチド、およびジシクロヘキシルカルボジイミド等の縮合剤をこれらが溶解する有機溶媒中で室温で攪拌することにより合成できる。④ 保護基を脱保護するのに用いられる条件は、用いた保護基の種類に大きく依存する。通常使用される脱保護条件は、加水素分解、トリフルオロ酢酸、無水フッ化水素、トリフルオロメタンスルホン酸-チオアニソール混合系、トリフルオロ酢酸-チオアニソール混合系等であるが、保護基の種類によってはさらに多様な手段が可能である。また、目的物の精製は、シリカゲルクロマトグラフィーおよびゲルろ過法等を用いることにより行う。

【0012】本発明の化合物を分散して製剤を製造するには、単独の水媒体中への分散あるいは分散助剤の併用のどちらで行ってもよい。分散助剤としては、卵黄レシチン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジミリスチルホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルグリセロール、スフィンゴミエリン、カルジオリピン等に代表される天然または合成の脂質、あるいはトリトンX-100、ポリエチレングリコール、ベンジルアルコール、ゼラチンなどの分散助剤として認可されている医薬品添加物の中から化合物に応じて選択される。なお、これらの医薬品添加物に関しては、日本薬学会1987年発行のファルマシアレビューNo. 22「医薬品添加物」に詳細に記述されており、これらの中から選択するのが好ましい。

【0013】本発明に係る分子集合体の製剤中の一般式〔I〕で表される化合物の配合量は特に限定されないが、好ましくは分散助剤1に対して0.1~9.0(重量比)の配合比である。また、ステロール等の添加物(例えば、コレステロール、β-シトステロール、スチグマステロール、カルベンスステロールなど)を混合してもよい。

【0014】一般式〔I〕で表される化合物とリン脂質を混合して分子集合体を形成させる方法としては、通常のリポソーム形成法すなわちボルテクシング法(J. Mol. Biol., 13, 238(1965))、ソニケーション法(Biochem., 8, 344(1969))、プレベシクル法(Neurosci. Res. Prog. Bull., 9, 273(1971))、エタノール注入法(Biochem. Biophys. Acta, 298, 1015(1973))、フレンチプレス法(FEBS. Lett., 99, 210(1973))、コール酸除去法(J. Biol. Chem., 246, 5477(1971))、トリトンX-100パッチ法(Eur. J. Biochem., 85, 255(1978))、Ca<sup>2+</sup>融合法(Biochem. Biophys. Acta, 394, 483(1975))、エーテル注入法(Biochem. Biophys. Acta, 443, 629(1976))、アニーリング法(Biochem. Biophys. Acta, 443, 313(1976))、凍結融解融合法(J. Biol.

Chem., 252, 7384(1977)), W/O/Wエマルジョン法(J. Colloid Interface Sci., 62, 149(1977)), 逆相蒸発法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194(1978))などの方法が知られているが、本発明では上記のいずれの調製法を用いてもよく、またこれらに限定されるものではない。

【0015】本発明で用いられるペプチド誘導体の投与方法は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法、すなわち非経口投与方法、例えば静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与等によって投与するのが好ましい。そのような注射用製剤を製造する場合、本発明のペプチド誘導体を例えば、後記実施例で示すようにPBS(NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5mM, NaCl 70mM)または生理食塩水に分散して、注射用製剤としてもよく、あるいは0.1N程度の酢酸水等に分散した後、凍結乾燥製剤としてもよい。この際上記の分散助剤を用いてもよい。このような製剤には、グリシンやアルブミン等の慣用の安定化剤を添加してもよく、血中半減期を延長させる等の目的のためコラーゲンやリポソーム等を担体としてもよい。

【0016】さらに、本発明のペプチド誘導体は、例えばリポソーム中に包含したマイクロカプセル剤とすれば、経口投与することも可能であり、座薬、舌下剤、点鼻スプレー剤等の形態にすれば、消化管以外からの粘膜から吸収させることも可能である。本発明のペプチド誘導体は、細胞接着性タンパク質のコア配列(EILDVPST)を有し、該コア配列を介して細胞接着性タンパク質と同様の機序で細胞に接着する。そのため、細胞接着性タンパク質のアゴニストまたはアンタゴニストとして様々な生物活性を示す。その他にも、免疫調整作用、創傷治癒作用、毛細血管中で起る癌細胞による血小板凝集の抑制作用、神経疾患治療作用等の広範な生物活性が認められる。

【0017】したがって、本発明のペプチド誘導体は、その少なくとも1種類を、場合により慣用の担体または医薬用製剤とともに癌転移抑制剤、創傷治癒剤、免疫抑制剤、血小板凝集抑制剤または神経疾患治療剤として患者に投与することが可能である。特に動物細胞接着阻害剤または血小板凝集・粘着抑制剤としての使用が好ましい。その投与量は、0.2μg/kg~400mg/kgの範囲で症状、年齢、体重等に基づいて決定される。

【0018】以下に本発明の化合物の合成例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、アミノ酸、各種保護基および脱保護試薬は通常用いられている略号を使って表した。また、他の化合物例もここに例示した方法で合成できる。

#### 【0019】

##### 【実施例】実施例1

以下に本発明の化合物1の合成例を示す。また、化合物2~7もここに例示した方法で合成できる。

##### ジアルキルグリセロールの合成

##### C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>OCH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>OHの合成

文献(Synthesis, 503, (1985))記載の方法により調製した1-ベンジルグリセロール12.0gをトルエン300mlに溶かし、この溶液に粉末水酸化カリウム16.0gと1-ブロモヘキサデカン8.2gを加え、反応混合物を8時間加熱還流した。反応液を室温になるまで放冷したのちヘキサン400mlで希釈した。水200mlで2回洗浄後無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮して無色油状物を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 ヘキサン/酢酸エチル=40:1)で精製し、1, 2-ジヘキサデシル-3-ベンジルグリセロールを41.2g(収率95.5%)を得た。物性値は文献(Biochemistry, 2, 394(1963))記載のそれと一致した。

【0020】得られた1, 2-ジヘキサデシル-3-ベンジルグリセロールを酢酸エチル250mlに溶解し、10%パラジウム-炭素1.5gを加えて、反応混合物を水素雰囲気下8時間反応させた。不溶性物質をセライトろ過して除き、セライト層を酢酸エチルで洗浄した。ろ液、洗液をあわせて減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルから再結晶してジアルキルグリセロールC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>OCH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>OHを無色結晶(34.4g)として得た。物性値は文献(Biochemistry, 2, 394(1963))記載のそれと一致した。

##### 【0021】保護ペプチドの合成

##### BocSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocThr(Bzl)(国産化学(株)から購入)(15.5g、50mmol)、ジイソプロピルエチルアミン(6.46g)、p-ニトロベンジルブロミド(10.8g)、酢酸エチル(200ml)の混合物を3時間加熱還流した。反応液を室温になるまで放冷した後に、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各200mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮して無色油状物BocThr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を定量的に得た。これにクロロホルム(100ml)、トリフルオロ酢酸(50ml)を加え、室温で30分間反応させた。溶媒を減圧留去した後に酢酸エチル(250ml)を加え、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各200mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮して無色油状物Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を定量的に得た。これにBocSer(Bzl)(国産化学(株)から購入)(14.8g、50mmol)、DCC(11.4g、55mmol)、HOBt(6.9g、45mmol)、DMF(150ml)を加え、0℃で30分間、室温で24時間反応させた。DCUreaを除去した後に溶媒を減圧留去し、クロロホルム100mlを加え、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各200mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮してシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 ヘキサン/酢酸エチル

40:1)により精製し、BocSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(28.3g)として得た。

BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(28.0g、45mmol)、BocPro(国産化学(株)から購入)(9.69g、45mmol)、DCC(10.3g、50mmol)、HOBT(6.1g、40mmol)、DMF(150ml)を加え、0℃で30分間、室温で24時間反応させた。DCUreaを除去した後に溶媒を減圧留去し、クロロホルム100mlを加え、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各200mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮してシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 クロロホルム/メタノール 99:1)により精製し、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(29.8g)として得た。

BocValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(28.8g、40mmol)、BocVal(国産化学(株)から購入)(8.7g、40mmol)、DCC(9.3g、45mmol)、HOBT(5.4g、35mmol)、DMF(150ml)を加え、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成と同様に行った。BocValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(29.4g)として得た。

BocAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(28.6g、35mmol)、BocAsp(OBzl)(国産化学(株)から購入)(11.3g、35mmol)、DCC(8.3g、40mmol)、HOBT(4.6g、30mmol)、DMF(150ml)を加え、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成と同様に行った。BocAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(33.7g)として得た。

BocLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(32.7g、32mmol)、BocLeu(国産化学(株)から購入)(7.4g、32mmol)、DCC(7.2g、35mmol)、HOBT(4.6g、30mmol)、DMF(150ml)を加え、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成と同様に行った。BocLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(33.5g)として得た。

BocIleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(33.0g、29mmol)、BocIle(国産化学(株)から購入)(6.7g、29mmol)、DCC(6.8g、33mmol)、HOBT(3.8g、25mmol)、DMF(150ml)を加え、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成と同様に行った。BocIleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(34.1g)として得

た。

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocIleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(33.7g、27mmol)、BocGlu(OBzl)(国産化学(株)から購入)(9.1g、27mmol)、DCC(6.2g、30mmol)、HOBT(3.8g、25mmol)、DMF(150ml)を加え、BocProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成と同様に行った。BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(34.1g)として得た。

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)の合成

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(1.47g、1mmol)を90%酢酸(40ml)に溶解し、亜鉛末(0.32g、5mmol)を加え、0℃で2時間室温で1時間攪拌した。残存する亜鉛をろ過し、ろ液を減圧濃縮し、クエン酸を加えて酸性にし酢酸エチルで抽出した。硫酸ナトリウムで乾燥した後に、減圧濃縮してシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 クロロホルム/メタノール 99:1)により精製し、BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を無色油状物(0.97g)として得た。

【0022】保護ペプチドとジアルキルグリセロール誘導体の縮合

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)の合成

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)(0.93g、0.7mmol)、C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>OCH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>OH(0.38g、0.7mmol)、DCC(0.17g、0.8mmol)、クロロホルム(50ml)を加え、0℃で30分間、室温で24時間反応させた。DCUreaを除去した後に溶媒を減圧留去し、クロロホルム100mlを加え、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各200mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮してシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 クロロホルム/メタノール 99:1)により精製し、BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)を白色粉末(1.04g)として得た。

【0023】脱保護および精製

化合物(1)の合成

BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)CH<sub>2</sub>(OC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>)(1.04g、0.6mmol)にクロロホルム(20ml)、トリフルオロ酢酸(20ml)を加え、室温で30分間反応させた。溶媒を減圧留去した後にクロロホルム(50ml)を加え、1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各50mlで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮して白色粉末H-Glu(OBzl)IleLeuAsp

(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OCH<sub>2</sub>CH(OC<sub>18</sub>H<sub>35</sub>)CH<sub>2</sub>(OC<sub>18</sub>H<sub>35</sub>)を定量的に得た。これを酢酸(50ml)に溶解し、10%パラジウム炭素1gを加え、室温で常圧加水素分解を24時間行った。セライトを用いて触媒をろ別し、溶媒を減圧留去した。シリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 クロロホルム・メタノール・水 65:25:4)により精製し、化合物(1)を730mg得た。

【0024】FAB-MS 1394 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(0.95), Ile(1.11), Leu(1.03), Asp(0.98), Val(0.89), Pro(0.99), Ser(0.92), Thr(0.89)

#### 実施例2

以下に化合物(2)の合成例を示す。

【0025】実施例1記載の方法にしたがい、化合物(2)を合成した。1-プロモヘキサデカン(1-プロモオクタデカンに変更してグリセロール誘導体を合成した。

FAB-MS 1450 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(1.04), Ile(1.09), Leu(1.09), Asp(0.91), Val(0.97), Pro(0.90), Ser(0.83), Thr(0.80)

#### 実施例3

以下に化合物(3)の合成例を示す。

【0026】実施例1記載の方法にしたがい、化合物(3)を合成した。1-プロモヘキサデカン(1-ヨード-3, 7, 11, 15-テトラメチルヘキサデカンに変更してグリセロール誘導体を合成した。

FAB-MS 1507 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(0.96), Ile(1.05), Leu(0.97), Asp(1.00), Val(1.13), Pro(0.91), Ser(0.82), Thr(0.85)

#### 実施例4

以下に化合物(4)の合成例を示す。

【0027】実施例1記載の方法にしたがい、化合物(4)を合成した。1-プロモヘキサデカン(1-プロモドデカンに変更してグリセロール誘導体を合成した。

FAB-MS 1282 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(1.07), Ile(1.06), Leu(1.08), Asp(1.03), Val(1.09), Pro(0.94), Ser(0.77), Thr(0.81)

#### 実施例5

以下に化合物(5)の合成例を示す。また、化合物(6)、(7)もここに例示した方法で合成できる。

【0028】文献(Synthesis, 503(1985))記載の方法により調製した1-ベンジルグリセロール18gを塩化メチレン100mlに溶解し、パルミトイルクロリド55g、トリエチルアミン20.2gを加え、室温で12時間攪拌した。これを1N炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水各100mlで数回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。硫酸ナトリウムをろ過して除き、ろ液を減圧濃縮してシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液 ヘキサン:酢酸エチル 40:1)により精製した。1, 2-ジパルミトイル-3-ベンジルーグリセロールを無色結晶として60g得た。以下、実施例1記載の方法で化

合物(5)を合成した。

【0029】FAB-MS 1422 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(1.10), Ile(0.99), Leu(1.05), Asp(0.98), Val(1.01), Pro(0.99), Ser(0.88), Thr(0.83)

#### 実施例6

以下に化合物(6)の合成例を示す。

【0030】実施例5記載の方法にしたがい、化合物(6)を合成した。保護ペプチドの合成は、BocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)をトリフルオロ酢酸で処理してBoc基を除去したGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)とBocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)OBzl(NO<sub>2</sub>)を亜鉛/酢酸で処理してp-ニトロベンジル基を除去したBocGlu(OBzl)IleLeuAsp(OBzl)ValProSer(Bzl)Thr(Bzl)をDCC-HOBt法によりフラグメント縮合した。

【0031】FAB-MS 2277 (M-H)  
 アミノ酸分析: Glu(0.99), Ile(1.08), Leu(1.09), Asp(0.99), Val(1.11), Pro(0.94), Ser(0.85), Thr(0.80)

#### 20 実施例7

以下に化合物(7)の合成例を示す。

【0032】実施例5記載の方法にしたがい、化合物(7)を合成した。パルミトイルクロリドをステアロイルクロリドに変更してグリセロール誘導体を合成した。保護ペプチドの合成は、BocGlyOBzl(NO<sub>2</sub>)を出発物質としてN端側へ逐次延長した。

FAB-MS 1535 (M-H)  
 アミノ酸分析: Gly(1.05), Glu(0.99), Ile(1.08), Leu(1.09), Asp(1.02), Val(1.08), Pro(0.92), Ser(0.88), Thr(0.79)

#### 30 実施例8

以下に本発明の化合物(1)の製剤例を示す。また、化合物(2)~(7)もここに例示した方法で製剤化できる。

【0033】本発明の化合物(1)(10mg)をクロロホルムに溶解し、溶媒を減圧留去して薄膜を形成させた。室温で1時間乾燥させた後に、PBS(10ml)を加えてプランソン社製超音波ホモジナイザーモデル250型で20W、15分間分散した。分散液をミリポア社製マイレクスGVによりろ過滅菌して注射用製剤を調製した。この製剤は、動物細胞用の接着阻害剤および血小板凝集・粘着抑制剤として使用可能である。

#### 実施例9

以下に本発明の化合物(5)の製剤例を示す。また、化合物(1)~(4)、(6)、(7)もここに例示した方法で製剤化できる。

【0034】本発明の化合物(5)(5mg)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(5mg)をクロロホルムに溶解し、溶媒を減圧留去して薄膜を形成させた。室温で1時間乾燥させた後に、生理食塩水(10ml)を加えて

ブランソン社製超音波ホモジナイザーモデル250型で20W、15分間分散した。分散液をミリボア社製マイレクスGVによりろ過滅菌して注射用製剤を調製した。この製剤は、動物細胞用の接着阻害剤および血小板凝集・粘着抑制剤として使用可能である。

#### 実施例10

以下に本発明の化合物(3)の製剤例を示す。また、化合物(1)、(2)、(4)~(7)もここに例示した方法で製剤化できる。

【0035】本発明の化合物(3)(5mg)、卵黄レシチン(5mg)、コレステロール(5mg)をクロロホルムに溶解し、溶媒を減圧留去して薄膜を形成させた。室温で1時間乾燥させた後に、生理食塩水(10ml)を加えてブランソン社製超音波ホモジナイザーモデル250型で20W、15分間分散した。分散液をミリボア社製マイレクスGVによりろ過滅菌して注射用製剤を調製した。この製剤は、動物細胞用の接着阻害剤および血小板凝集・粘着抑制剤として使用可能である。

#### 実施例11

以下に本発明の化合物の試験例(細胞接着阻害活性の測定)を示す。

【0036】本発明のペプチド誘導体は、細胞のフィブロネクチンに対する接着を阻害する。その活性測定方法は、基本的に生化学の分野で広く用いられている競争法であり、例えば特開平1-309682号、特開平2-174797号、\*

表 1

| ペプチド誘導体  | フィブロネクチンに対する細胞の接着率(%) |      |     |     |            |
|----------|-----------------------|------|-----|-----|------------|
|          | 0                     | 0.25 | 0.5 | 1.0 | 2.0(mg/ml) |
| BILDVPST | 100                   | 70   | 25  | 22  | 19         |
| 化合物1     | 100                   | 67   | 31  | 22  | 11         |
| 化合物2     | 100                   | 65   | 26  | 20  | 13         |
| 化合物3     | 100                   | 60   | 29  | 23  | 13         |
| 化合物4     | 100                   | 61   | 25  | 14  | 10         |
| 化合物5     | 100                   | 68   | 24  | 20  | 11         |
| 化合物6     | 100                   | 66   | 25  | 16  | 10         |
| 化合物7     | 100                   | 64   | 24  | 16  | 11         |

#### 実施例12

以下に本発明の化合物の試験例(血小板凝集阻害活性の測定)を示す。

【0038】本発明のペプチド誘導体のIN VITRO系での血小板凝集抑制作用をヒト多血小板血漿を用いて検定した。

#### 実験方法

新鮮なヒト血液に1/9量の3.8%クエン酸ナトリウムを加え、遠心分離(1000rpm、10分間)をして、上層を多血小板血漿として分取した。この血漿200μ

\*Methods in Enzymology 第82巻、803(1981)に開示されている。

#### 1) 吸着プレートの作製

市販のヒト由来のフィブロネクチン(コスモバイオ(株)から購入)をPBS(リン酸緩衝液)で10μg/mlに溶解し、その溶液50μlを96wellのポリスチレンプレートに入れ、4℃で一晩保温してコーティングした。次に非特異吸着を防ぐ目的で牛血清アルブミン(BSA1%)を加え、37℃、1時間保温し、その後洗浄操作(PBS)を行い充分に水切りして吸着プレートを作製した。

#### 2) 接着阻害実験

Dulbecco's Modified Eagles Mediumに分散したペプチド誘導体分散液50μlを上記の方法で作製したプレートに入れ、そこへNRK49F(1×10<sup>6</sup>cells/ml)懸濁液を50μl加え、37℃で1時間保温し、細胞を接着させた。PBSで3回洗浄し、未接着の細胞を除去した後、0.025%EDTAトリプシン溶液で接着した細胞を剥離し、0.2%トリパンブルーで染色して細胞数を計測した。結果を表1に示す。表中、EILDVPSTはグルタミン酸-イソロイシン-ロイシン-アスパラギン酸-バリン-プロリン-セリン-トレオニンのオクタペプチドを表す。

【0037】

1にペプチド誘導体25μl(max 1.5mg/ml)を加え、3分間37℃でインキュベートした後、20~50μM ADP(アデノシン2リン酸)溶液あるいは200μl/mlのコラーゲン溶液を25μl加えて、凝集の程度をアグリゴメーターを用いて透過度を測定することにより検定した。結果を表2に示す。

【0039】凝集阻害率(%)  $(1 - T/T_0) \times 100$

T<sub>0</sub>: ペプチド誘導体非添加時の透過度

T: ペプチド誘導体添加時の透過度



表 2

| 血漿板凝集抑制 I C <sub>50</sub> (μg/ml) |       |         |
|-----------------------------------|-------|---------|
| ペプチド誘導体                           | ADP刺激 | コラーゲン刺激 |
| BILDVPST                          | 27    | 25      |
| 化合物1                              | 20    | 17      |
| 化合物2                              | 16    | 14      |
| 化合物3                              | 21    | 20      |
| 化合物4                              | 18    | 19      |
| 化合物5                              | 19    | 21      |
| 化合物6                              | 22    | 20      |
| 化合物7                              | 19    | 21      |

【0040】

\*配列の長さ: 16

【配列表】

配列の型: アミノ酸

【0041】配列番号: 1

トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 8

配列の種類: ペプチド

配列の型: アミノ酸

フラグメント型: N末端フラグメント

トポロジー: 直鎖状

20 配列

配列の種類: ペプチド

フラグメント型: N末端フラグメント

配列

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1

5

【0042】配列番号: 2

\*

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr

1

5

10

15

【0043】配列番号: 3

フラグメント型: N末端フラグメント

配列の長さ: 9

30 配列

配列の型: アミノ酸

Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr Gly

トポロジー: 直鎖状

1

5

配列の種類: ペプチド

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

// C 0 7 K 99:00

DIALOG(R) File 352:Derwent WPI

(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009274397 \*\*Image available\*\*

WPI Acc No: 1992-401808/199249

XRAM Acc No: C92-178148

New peptide deriv. with substd. glycerol terminal - used as cancer metastasis inhibitor, wound healer, immune inhibitor, neuropathia treatment etc.

Patent Assignee: FUJI PHOTO FILM CO LTD (FUJF )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

| Patent No  | Kind | Date     | Applicat No | Kind | Date     | Week     |
|------------|------|----------|-------------|------|----------|----------|
| JP 4297494 | A    | 19921021 | JP 9162147  | A    | 19910326 | 199249 B |

Priority Applications (No Type Date): JP 9162147 A 19910326

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

JP 4297494 A 9 C07K-007/06

Abstract (Basic): JP 4297494 A

A peptide deriv. of the formula: (Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr-(Gly))<sub>n</sub>-OCH<sub>2</sub>-CH(OR<sub>1</sub>)-CH<sub>2</sub>OR<sub>2</sub>, where (Gly) is glycine residue opt. present, n is an integer of 1 to 3; and R<sub>1</sub> and R<sub>2</sub> are respectively. hydrogen or a straight or branched chain acyl or 8-24C alkyl, opt. substd. and (un)satd., the asymmetric carbon present in the molecule may be racemic or optically active, or a salt thereof.

An adhesion inhibitor for animal cell contg. the above peptide deriv. (salt) and a platelet aggregation inhibitor contg. the above peptide deriv. (salt) are also claimed.

USE/ADVANTAGE - The deriv. can be used in a cancer metastasis inhibitor, a wound healer, an immune inhibitor, a platelet aggregation inhibitor or a neuropathia treating drug.

In an example, 12.0 g 1-benzylglycerol was dissolved in 300 ml toluene and then 16.0 g KOH and 82 g 1-bromohexadecane were added and the mixture is refluxed for 8 hrs. After cooling to room temp., it was diluted with 400 ml hexane and washed with 200 ml water twice and dried on anhydrous Na sulphate and filtered and concn. in vacuo to give a colourless oil. It was purified by silica gel chromatography to give 41.2 g 1,2-dihexadecyl-3-benzylglycerol (Yield: 95.6%). It was reacted with Pd-C to give 34.4 g dihexadecylglycerol. It was condensed with a protected peptide and the condensate was deprotected to give the cpd. (II). It showed a platelet aggregation inhibition, IC<sub>50</sub>, of 20 micro-g/ml for ADP stimulation and 25 micro-g/ml for collagen stimulation.

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; PEPTIDE; DERIVATIVE; SUBSTITUTE; GLYCEROL; TERMINAL; CANCER; METASTASIS; INHIBIT; WOUND; IMMUNE; INHIBIT; TREAT

Derwent Class: B04

International Patent Class (Main): C07K-007/06

International Patent Class (Additional): A61K-037/02; C07K-007/08;

C07K-007/10; C07K-099-00

File Segment: CPI

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**